

12.11.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 13 JAN 2005

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 1 月 4 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 7 4 8 3 6
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 7 4 8 3 6]

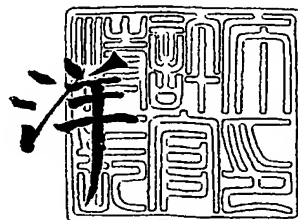
出 願 人 明 治 乳 業 株 式 会 社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 2 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 M1-A0302
【提出日】 平成15年11月 4日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所
 内
 【氏名】 坪井 洋
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所
 内
 【氏名】 池上 秀二
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所
 内
 【氏名】 神山 智敬
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社研究企画部内
 【氏名】 紀 再思
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社栄養科学研究所
 内
 【氏名】 浅見 幸夫
【特許出願人】
 【識別番号】 000006138
 【氏名又は名称】 明治乳業株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
 【識別番号】 100108774
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 041092
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

ケルセチンからなるアドレナリン β_3 受容体作動物質。

【請求項 2】

ケルセチンが植物由来である、請求項 1 の物質。

【請求項 3】

植物がハス科である、請求項 2 の物質。

【請求項 4】

請求項 1 乃至請求項 3 に記載の物質を含む、糖尿病の治療または予防のための薬剤。

【請求項 5】

請求項 1 乃至請求項 3 に記載の物質を含む、脂肪代謝改善効果を有する、肥満の治療または予防のための薬剤。

【請求項 6】

請求項 1 乃至請求項 3 に記載の物質を含む、糖尿病の治療または予防のための食品。

【請求項 7】

請求項 1 乃至請求項 3 に記載の物質を含む、肥満の治療または予防のための食品。

【請求項 8】

ケルセチンを含むハスの調製物からなる、アドレナリン β_3 受容体作動物質。

【書類名】明細書

【発明の名称】植物由来アドレナリン β_3 作動物質およびその利用

【技術分野】

【0001】

本発明は、ハスの葉から調製した新規なアドレナリン β_3 作動物質に関する。

【背景技術】

【0002】

生活習慣の近代化・欧米化に伴い、肥満である人の割合は世界的に増加傾向にある。肥満は糖尿病、高血圧、動脈硬化症といった生活習慣病をもたらし、死亡率を上昇させることから、肥満の予防、治療は公衆衛生上の重要な課題である。肥満の治療の基本は食事療法と運動療法にあるが、これらによる改善が困難な症例については薬物による治療が取り入れられる場合もある。

【0003】

肥満は脂肪細胞に過剰の中性脂肪（トリグリセリド）が蓄積した状態である。脂肪細胞には、白色脂肪と褐色脂肪が存在する。白色脂肪細胞は皮下、内臓周囲など全身に広く分布する比較的大型の細胞であり、細胞体の大部分は巨大な脂肪滴で占められる。一方の褐色脂肪細胞は、存在部位が肩甲間、腋下部などに限定され、脂肪も多くの小滴に分かれた多房性構造となっており、それに近接して多数のミトコンドリアが存在する。白色脂肪と褐色脂肪の生理機能は大きく異なり、白色脂肪が余剰エネルギー貯蔵の場であるのに対し、褐色脂肪は脂肪を酸化分解することによりエネルギーを熱として放出する場である。白色細胞に蓄積された脂肪は、エネルギー不足状態において分解され脂肪酸となり、血中に放出され全身で消費されるが、褐色脂肪が刺激により脂肪酸へ分解された場合は、褐色脂肪細胞内で直ちに酸化され熱となる（非特許文献1/Saito M., Sasaki N. 実験医学 Vol.14 NO.16,1996）。

【0004】

アドレナリン β_3 受容体が脂肪分解に関与していることが知られている。アドレナリン β 受容体は β_1 、 β_2 、 β_3 のサブタイプに分類される。いずれも約400個のアミノ酸からなる膜7回貫通型レセプターであるが、 β_1 、 β_2 とのアミノ酸相同性は約50%に過ぎない。 β_1 受容体が心臓等に、 β_2 受容体が気管支平滑筋等に主として存在するのに対し、 β_3 受容体は主として脂肪組織に存在するほか、腸管や脳などの組織にも存在する。

【0005】

β_3 受容体アゴニスト（作動物質）が脂肪細胞においてcAMPの集積を促進することが知られている（非特許文献2/医学のあゆみ Vol.192 NO.5 2001.1.29）。 β_3 受容体アゴニストは、白色脂肪細胞において脂肪分解を促進すると同時に褐色脂肪細胞を活性化する。 β_3 受容体の活性化は、熱産生の増加、褐色脂肪の活性化、体脂肪の減少などの肥満軽減のほか、インスリン抵抗性の軽減の効果をもたらすことが知られている（非特許文献3/J Clin Invest. 1996 Jun 15;97(12):2898-904., Life Sci. 1994;54(7):491-8.）。これまでに、大日本製薬と武田薬品工業による「AJ-9677」等、いくつかの β_3 受容体アゴニストが抗肥満薬・抗糖尿病薬として開発されている。

【0006】

一方、ハス科の多年草であるハス（*Nelumbo nucifera*）は、その根が食用として利用される以外にも、種子や葉などは漢方薬の処方や健康食品などに広く用いられている。ハスの葉には肥満改善効果があることが知られているが（特許文献1/特開平8-198769）、ハスの肥満効果を示す有効成分やその作用について、これまで詳細な報告はない。

【特許文献1】特開平8-198769

【非特許文献1】Saito M., Sasaki N. 実験医学 Vol.14 NO.16,1996

【非特許文献2】医学のあゆみ Vol.192 NO.5 2001.1.29

【非特許文献3】J Clin Invest. 1996 Jun 15;97(12):2898-904., Life Sci. 1994;54(7):491-8.

【非特許文献4】Biochemical Pharmacology, Vol.47, No.3, pp521-529

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は第一にハス科植物の有効成分を明らかにすることであり、また、第二にこの有効成分に基づいた新たな物質、具体的にはアドレナリン β_3 作動物質を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記目的を達成すべく、本発明者らはハスの葉の抽出物を作製し、肥満改善効果の有効成分を突き止めるべく鋭意努力研究を続けた結果、その有効成分の一つがケルセチンであることを見出した。ケルセチンは植物に広く存在するフラボノイドの一種であるが、本願発明者は、ケルセチンがハスに含まれることを新たに明らかにした。ケルセチンに関するこれまでの知見としては、ケルセチンをラット脂肪細胞に作用させた結果cAMPが集積したこと、ケルセチンがラットアドレナリン β レセプターアゴニスト活性を有することを示唆する報告はあったが (Biochemical Pharmacology, Vol. 47, No. 3, pp521-529)、ヒトのアドレナリン β_3 レセプターに対するアゴニスト活性については実証されていない。本発明者らは、ケルセチンをヒト β_3 アドレナリンレセプター発現細胞や糖尿病モデルマウスに作用させ、その効果を評価した結果、ケルセチンがアドレナリン β_3 アゴニストとして作用することにより肥満改善効果及び抗糖尿病作用をもたらすことを具体的に見出した。すなわち、ハスの葉調製物を配合することにより、肥満改善、糖尿病改善に効果を有する医薬品、食品の開発が可能となることを見出し、本発明を完成した。

【0009】

即ち、本発明は、ハスの葉から調製した新規なアドレナリン β_3 作動物質に関し、より詳しくは、下記発明に関する。

- (1) ケルセチンからなるアドレナリン β_3 受容体作動物質
- (2) ケルセチンが植物由来である、上記(1)の物質
- (3) 植物がハス科である、上記(2)の物質。
- (4) 上記(1)乃至上記(3)に記載の物質を含む、糖尿病の治療または予防のための薬剤。
- (5) 上記(1)乃至上記(3)に記載の物質を含む、脂肪代謝改善効果を有する、肥満の治療または予防のための薬剤。
- (6) 上記(1)乃至上記(3)に記載の物質を含む、糖尿病の治療または予防のための食品。
- (7) 上記(1)乃至上記(3)に記載の物質を含む、肥満の治療または予防のための食品。
- (8) ケルセチンを含むハスの調製物からなる、アドレナリン β_3 受容体作動物質。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、ケルセチンをアドレナリン β_3 受容体作動物質として提供することが可能となった。本発明の物質は、特に、肥満改善、糖尿病治療の新たな選択肢として使用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明は、ケルセチンからなるアドレナリン β_3 受容体作動物質を提供する。本発明は、上述の通り、ハスの葉抽出物中の有効成分としてケルセチンが含まれることを見出し、さらには、このケルセチンがアドレナリン β_3 受容体作動活性があることを見出したことにも基づくものである。

【0012】

ケルセチンは、正式には3,3',4',5,7-ペンタヒドロキシフラボン (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) といい、植物に広く存在するフラボノールの一種である。3位、7位また

は両方に多種の糖が結合するため、多くの配糖体が見られ、植物においてケルセチンは主に配糖体として存在する（生化学辞典（第3版） 東京化学同人、化学大辞典 東京化学同人）。このように、一般的にケルセチンは、配糖化されていない状態を指すが、本書における「ケルセチン」は、アドレナリン β_3 受容体作動物質として機能する限り、上記非配糖体（3,3',4',5,7-ペンタヒドロキシフラボン）のみならず、ケルセチン配糖体をも含めることができる。なお、配糖体の例としてはケルセチン-3-グルクロナイド、ケルセチン-3-グルコシド（イソケルシトリン）、ケルシトリン、クエルシメリトリン、ルチンなどを挙げることができる。こうした配糖体がアドレナリン β_3 受容体作動活性を有するかは、アドレナリン β_3 受容体を刺激した際の細胞内におけるcAMPの集積促進に基づいて確認することができる。より具体的には、アドレナリン β_3 受容体作動物質としての活性は、実施例のように、 β_3 受容体を発現させた細胞に被験物質を添加し、cAMPの集積を測定することによって確認することができる。cAMP活性は、EIA法、ELISA法、RIA法などの当業者に周知の抗体法により測定することができる。市販のキットを用いることも可能である。

【0013】

また、ケルセチンである限り、由来する植物種、部位に限定されない。本発明はハスの葉抽出物から見出されたものであるが、アドレナリン β_3 受容体作動活性がある限り、ハス以外の植物から調製されたケルセチンを含めることができる。例えば、ケルセチンを含む植物として、従来から玉ねぎやブロッコリー、茶などが知られており、これ以外にもハスが属するハス科植物や、近縁のスイレン属、オニバス属、コウホネ属、ジュンサイ属にも含有されると考えられる。したがって、アドレナリン β_3 受容体作動物質としてのケルセチンは、これら植物から得ることができる。植物からのケルセチン調製の一例としては、後述する実施例に示したハスの葉からケルセチンを抽出する例を挙げることができる。

【0014】

ケルセチンを得るために使用する植物の部位の代表例として、葉を挙げることができるが、ケルセチンが含まれる部位であれば、花、根、茎、実などの他の部位でも使用可能である。

【0015】

また、ケルセチンは、植物から有効に精製することができるが、化学的に合成されたもの、微生物を用いて生物学的に合成されたもの等を用いてもよい。上述した植物から採取したケルセチンはそのまま用いてもよく、また、アドレナリン β_3 受容体アゴニストとしての活性を損なわない範囲で、あるいは該活性を一層有効に利用するために植物から採取後に修飾を施してもよい。さらにケルセチンは必ずしも精製される必要は無く、ケルセチンが含まれていれば、植物の抽出液、抽出乾燥物、さらには植物を粉末状等にしたもの等の植物調製物を用いてもよい。

【0016】

ケルセチンにおける上記アドレナリン β_3 受容体作動活性は、ヒト、マウスの受容体に対して確認できていることから、これらヒト、マウスなどを含む哺乳動物のアドレナリン β_3 受容体に対するアゴニストとして用いることができる。 β_3 受容体アゴニストは、白色脂肪細胞における脂肪分解促進と同時に褐色脂肪細胞を活性化する作用や、熱産生の増加、褐色脂肪の活性化、体脂肪の減少などに基づく肥満軽減、インスリン抵抗性の軽減などの効果が報告されている。したがって、本発明のケルセチンは、とりわけ、肥満の治療または予防のための薬剤や糖尿病の治療または予防のための薬剤として利用し得る。また、これ以外にも、アドレナリン β_3 受容体作動に基づいて疾患の治療に利用してもよい。

【0017】

本発明はケルセチンからなるヒトアドレナリン β_3 受容体作動物質を含む糖尿病の治療または予防のための薬剤、食品を提供する。糖尿病は、インスリン作用不足による持続的な高血糖を特徴とし、発症に遺伝的要因と環境的要因が関連する疾患群である。その成因や病態は単一ではなく、糖尿病は発症原因またはインスリン作用不足程度により分類され

ている。発症原因による分類では、1型糖尿病、2型糖尿病、その他特定の型および妊娠糖尿病に分けられる。1型糖尿病は、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞の破壊を発症の特徴とする。2型糖尿病は、インスリン分泌低下とインスリン感受性の低下（インスリン抵抗性）の両者が発症にかかわる。その他特定の型としては、他の疾患に伴うもの等が分類される。インスリン作用不足程度による分類では、インスリン依存状態、インスリン非依存状態に分類される。インスリン依存状態には、1型の多くが当てはまる。インスリン非依存状態には2型の多くが当てはまり、さらに、高血糖是正にインスリン治療が必要な状態とインスリン治療が必要でない状態に分類される。上述したように、 β_3 受容体の活性化はインスリン抵抗性の軽減の効果をもたらすことが知られており、したがって、アドレナリン β_3 受容体作動物質であるケルセチンを含む薬剤は、糖尿病の治療または予防に用いることができる。本発明における薬剤が有効である糖尿病としては、2型の糖尿病を挙げることができるが、ケルセチンからなるアドレナリン β_3 受容体作動物質を含む薬剤であって、糖尿病の治療または予防を目的とするものであれば、他の型の糖尿病に有効であるものも本発明に包含される。

【0018】

薬剤、食品が糖尿病に有効であるか否かは、例えば本発明における実施例のように、糖尿病を発症した被験動物に薬剤を投与し、該被験動物の血糖値を測定することにより知ることができる。薬剤投与前後の随時血糖値または空腹時血糖値を薬剤投与群と対照群の間で比較し、薬剤投与群の血糖値が対照群と比較して低下すれば、その薬剤は糖尿病に有効である。被験動物としては、糖尿病モデル動物、例えばKK- A^y マウスを用いることができる。

【0019】

さらに、本発明はケルセチンからなるヒトアドレナリン β_3 受容体作動物質を含む、脂肪代謝改善効果を有する肥満の治療または予防のための薬剤、食品を提供する。前述のとおりアドレナリン β_3 受容体作動物質は脂肪代謝効果を有するため、ヒトアドレナリン β_3 受容体作動物質であるケルセチンは、ヒトの肥満の治療または予防のための薬剤として利用することができる。脂肪代謝改善効果は、例えば、被験物質を脂肪細胞に添加し、脂肪分解物であるグリセロール量を測定することで評価することができる。グリセロール量は、グリセロールキナーゼ等により分解し、最終的に吸光度を測定することで得ることができる。被験物質により細胞中のグリセロール量が増加すれば、被験物質に脂肪代謝改善効果が存在すると評価できる。また、*in vivo*の効果については、被試験動物の一部の群に高脂肪食及び被験物質を与え、他の一群には被験物質を与えずに高脂肪食のみを与え、他の条件を同一とした下で両動物群を一定期間飼育した後に、動物群の内臓脂肪の量を比較することで評価することができる。被験物質を与えられた群の内臓脂肪の量が、高脂肪食のみの群と比較して少なければ、被験物質に脂肪代謝改善効果が存在すると評価できる。

【0020】

ケルセチンからなるヒトアドレナリン β_3 受容体作動物質を製剤化して医薬品とする場合には、治療目的や投与経路等に応じて剤形を選択することができ、例えば、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、注射剤、坐剤、エリキシル剤、シロップ剤、浸剤・煎剤、チンキ剤等が挙げられる。また製剤化のために、必要に応じて充填剤、増量剤、結合剤、保湿剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤等の希釈剤あるいは賦形剤を用いることができる。また、この医薬製剤中に着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品を医薬製剤中に含有させてもよい。

【0021】

ケルセチンからなるヒトアドレナリン β_3 受容体作動物質を含む食品の形態としては、例えば、茶、健康茶、健康食品、特定保健用食品、栄養補助食品、経腸栄養食品等を挙げることができる。ケルセチンからなるヒトアドレナリン β_3 受容体作動物質と食品衛生上許容される配合物、例えば、安定化剤、保存剤、着色料、香料、ビタミン等の配合物を上記リン酸化デキストランに適宜添加し、混合し、常法により、錠剤、粒状、顆粒状、粉末状、カプセル状、液状、クリーム状、飲料等の食品とすることができる。

【実施例】

【0022】

以下、実施例によりさらに本発明を詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に制限されるものではない。

【0023】

【実施例1】 ハスの葉抽出物の製造法

乾燥したハスの葉 1 kg に対し、水 10 L を加える。pH を 6.0 に調整し、30 分間室温にて静置する。その後、減圧下 90℃ で 1 時間沸騰抽出する。ろ液 (i) と残渣に分別し、残渣には 10 倍量の水を加え、減圧下 90℃ で 1 時間沸騰抽出する。ろ液 (ii) と残渣に分別し、ろ液 (i) とろ液 (ii) をあわせる。減圧下、加熱濃縮により、比重 1.1 まで濃縮後、スプレードライヤーで乾燥粉体約 100 g を得た。

【0024】

【実施例2】 ケルセチンおよびケルセチン配糖体の同定および精製

ハスの葉抽出物を LC/MS により分析した。カラムは Capcell Pak C18 UG120 ϕ 2.0×150 mm (資生堂) を使用した。移動相は A 液 (1% 酢酸を含む 5% アセトニトリル水溶液) および B 液 (1% 酢酸を含む アセトニトリル) を選択し、A 液から B 液まで 30 分間で直線濃度勾配をつけて溶出した。カラム温度: 40℃、注入量: 5 μ L とした。イオン化は ESI 法 (Negative) で行った。対照標品として、市販ケルセチン (和光純薬工業 (株) ケルセチン二水和物)、市販ケルシトリン (東京化成工業 (株)) および市販イソケルシトリン (EXTRASYN THESE 社) を使用し、同様に分析した。RT: 16.4 min, m/z: 301 のピークが標品の RT および m/z と一致したため、ハスの葉抽出物にケルセチン (分子量 302) の存在が確認された。同様にハスの葉抽出物にケルシトリン (分子量 448) の存在 (RT: 13.8 min, m/z: 447) およびイソケルシトリン (分子量 464) の存在 (RT: 12.9 min, m/z: 463) が確認された。また、RT: 13.2 min, m/z: 477 のピークはケルセチン-3-グルクロナイド (Q3GA) (分子量 478) と推定された。

【0025】

ハスの葉抽出物から Q3GA の精製および構造決定を次の通り行った。

まず、ハスの葉抽出物 1 g を超純水 (ミリ Q 水) 500 mL で溶解し、6N 塩酸で pH 3 に調整した。酢酸エチル 500 mL で 3 回抽出し、無水硫酸マグネシウムで脱水した。この酢酸エチル層を減圧下濃縮し、酸性画分 (147 mg、収率 14.7%) を得た。次に、上記酸性画分 5 mg ずつ 30 回にわけて HPLC を用いて精製した。HPLC による精製条件は次の通りである。精製用カラムは、Capcell Pak C18 UG120 ϕ 20×250 mm (資生堂) を使用した。カラム温度: 40℃、注入量: 200 μ L とした。移動相には 1% 酢酸を含む 50% アセトニトリル水溶液を用いて所定の溶出速度 (5 mL/分) で溶出させ、360 nm で検出した。この条件により Q3GA を含む画分 (63.1 mg、収率 42.1%) を得た。さらに上記画分を Sephadex LH-20 (ϕ 12×350 mm, MeOH) を用いて精製し、Q3GA と推定される化合物 (13.5 mg) を得た。

【0026】

続いて、得られた化合物を NMR により解析した。¹H-NMR、¹³C-NMR、DEPT、H-H COSY、HMQC および HMBC を測定し、文献値 (J. Agric. Food Chem., 46, pp. 4898-4903 (1998)) と比較した結果、測定値は Q3GA の文献値と一致したことから、ハスの葉抽出物に Q3GA の存在が確認された。

【0027】

【実施例3】 ヒト β_3 アドレナリン受容体発現組換え体細胞の作製

ヒト β_3 アドレナリン受容体 cDNA は、ヒト小腸由来 cDNA ライブラリー (宝酒造) を鋳型とし、以下に示す合成オリゴ DNA をプライマーとした PCR 法により合成した。

5' 側オリゴプライマー: ccgctagccaccatggctccgtggcctcaccgagaag (配列番号: 1)

3' 側オリゴプライマー: ccgaattctaccgctcgagccgttggaag (配列番号: 2)

【0028】

PCR 合成した cDNA は、セファクリル S-300 で脱塩および未反応のプライマーを除去した後、あらかじめプライマー設計時に末端に挿入しておいた制限酵素サイト NheI と EcoRI で消

化、さらにSpeIとEcoRI制限酵素で消化した動物発現ベクターであるpTracer-EF A (インビトロジェン) とライゲーションキット (宝酒造) を用いてライゲーション反応を行った。ライゲーション後のDNAはエタノール沈殿し、適量の10%グリセロール水溶液に懸濁した。該DNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株をエレクトロポレーション法により形質転換した。操作後の細胞はアンピシリンを含むLB寒天平板培地に蒔き、37℃一夜培養して形質転換体のコロニーを得た。10個の形質転換体中の β_3 受容体cDNAの塩基配列をプライドバイオシステムズ社オートシーケンサーにて確認し、正確なヒト β_3 アドレナリン受容体cDNAが動物発現用ベクターに挿入された複合プラスミドを選択した。

【0029】

上記ヒト β_3 アドレナリン受容体発現用複合プラスミドは、大腸菌細胞よりアルカリ溶解放法 (Sambrook & Russell, Molecular Cloning, 3rd Edition) により抽出、精製した。精製した複合プラスミドはチャイニーズハムスター卵巣細胞であるCHO-K1細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションはTransIT-LT1試薬 (宝酒造) を用いたりポフェクチン法で行った。10cmのディッシュに20-30%の細胞密度で増殖させた細胞に対して、10 μ gの複合プラスミドと混合したTransIT-LT1を加え細胞に取り込ませた。トランスフェクション処理の後、細胞は3日間10%牛胎児血清 (以下FCSと略す。) 添加ダルベッコ変法イーグル培地 (以下DMEMと略す。) (シグマ) で37℃、5%CO₂条件下で培養し、その後500 μ g/mLでゼオシン (インビトロジェン) を加えたDMEM培地に交換し、同様な条件下で培養した。ゼオシン存在下で生育、コロニーを形成してきた細胞は、トリプシンではがしてさらにゼオシンおよび10%FCS含有のDMEM培地で増殖させた。

【0030】

得られた組換え体細胞は96ウェルマイクロプレートで100%細胞密度になるように培養した。培地を除きダルベッコ変法燐酸緩衝液 (以下PBSと略す。) (宝酒造) で細胞を一回洗い、10 μ Mイソプロテレノール含有アッセイ用緩衝液 [DMEM、10%FCS、20mM HEPES (pH7.2)、0.1mMイソブチルメチルキサンチン] を100 μ L添加した。その際のコントロールは、イソプロテレノールを含まないアッセイ用緩衝液のみとした。37℃で20分間インキュベーションした後細胞をPBSで一度洗い、cAMP定量用のEIAキット (アマシャムバイオサイエンス) を用いた細胞内cAMPの定量に供した。その結果 β アドレナリン受容体アゴニストであるイソプロテレノール添加により、細胞内cAMP量が大きく上昇する組換え体細胞を選択した。選択した組換え体細胞はさらに培養し、トリプシンで剥がした後培養用の培地で希釈し、96穴マイクロプレートに1ウェルあたり1細胞が入るように分注した。それらの細胞はさらに培養し、同様の操作によりイソプロテレノールに対する反応性を確認することで、反応性の良い組換え体細胞の純化を行い、最終的にひとつのヒト β_3 アドレナリン受容体発現組換え体6H-4d3を得た。

【0031】

[実施例4] ヒト β_3 アドレナリン受容体アゴニスト活性の測定

ヒト β_3 アドレナリン受容体発現組換え体6H4-2d3は96ウェルマイクロプレート中、10%FCS、500 μ g/mLゼオシン含有DMEM培地にて37℃、5%CO₂条件下で培養した。2-3日培養しておよそ100%の細胞密度に生育させた後培地を除き、PBSで細胞を一回洗い、測定しようとする検体を加えたアッセイ用緩衝液 [DMEM、10%FCS、20mM HEPES (pH7.2)、0.1mMイソブチルメチルキサンチン] を100 μ L/ウェルで添加した。37℃で10分間インキュベーションした後細胞をPBSで一度洗い、cAMP定量用のEIAキット (アマシャムバイオサイエンス) を用いた細胞内cAMPの定量に供した。陰性コントロールとしてはアッセイ用緩衝液のみか、アッセイ用緩衝液に検体を溶解した溶媒を同量添加した溶液で処理した6H4-2d3細胞を用い、陽性コントロールとしてイソプロテレノールで処理した6H4-2d3細胞を用いた。またヒト β_3 アドレナリン受容体に対する特異的な反応により細胞内cAMPの上昇が起きたかどうかを確認するために、6H4-2d3細胞の親細胞であるCHO-K1細胞に対してもまったく同様の処理を行い、細胞内cAMPの変化を確認した。測定は同検体で3回測定して平均値と標準偏差を用いた。

【0032】

ハスの葉抽出乾燥物の β_3 アドレナリンレセプター・アゴニスト活性を調べるため、ハスの葉抽出乾燥物を検体として、上記測定をおこなった。すなわち、ハスの葉抽出乾燥物を被験培地中に 0.5mg/mL、1mg/mL、2mg/mL 濃度で添加し、 β_3 アドレナリンレセプターを発現させた CHO・K1 細胞と発現させていないもとの CHO・K1 細胞に対する反応を見た。なお、陽性コントロールとしてイソプロテレノール 1 μ M をおいた。その結果、ハスの葉抽出乾燥物添加によって、 β_3 アドレナリンレセプターを発現させた CHO・K1 細胞のみに cAMP の有意な集積がみられ、アゴニスト活性を持つことが明らかとなった。結果を図 1 に示す。

【0033】

また、ケルセチンの β_3 アドレナリンレセプター・アゴニスト活性についても調べるため、ケルセチンを検体として、同様に測定を行った。ハスの葉抽出乾燥物の主成分であるケルセチンを被験培地中に 15 μ M、30 μ M、60 μ M 濃度で添加し、ヒト β_3 アドレナリンレセプターを発現させた CHO・K1 細胞と発現させていないもとの CHO・K1 細胞に対する反応を見た。なお、陽性コントロールとしてイソプロテレノール 2 μ M をおいた。その結果、ケルセチン添加によって、ヒト β_3 アドレナリンレセプターを発現させた CHO・K1 細胞のみに cAMP の有意な集積がみられ、ケルセチンがアゴニスト活性を持つことが明らかとなった。結果を図 2 に示す。

【0034】

[実施例 5] 3T3-L1 細胞を用いた脂肪分解作用の測定

マウス由来の前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞（ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入）を 96 穴プレートに 1×10^4 /well になるように加え、10% 牛胎児血清（FCS）添加 Dulbecco's modified Eagle medium（D-MEM, GIBCO 社製）にて 5% CO₂ 存在下、37℃ にて培養した。細胞がコンフルエントになる直前、0.5mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン、 2×10^{-7} M デキサメタゾン および 0.8 μ M インスリンを添加した 10% FCS 添加 D-MEM に交換し脂肪細胞への分化を誘導した。2 日後 0.8M インスリンのみを添加した 10% FCS 添加 D-MEM に交換し、以後 2～3 日ごとに培養液を交換して培養を続け脂肪細胞へと分化させた。その後、10% FCS 添加 D-MEM に交換し 2 日間培養した。96 穴プレートで培養したこの細胞の培養液を吸引除去し、被験物を含む 10% FCS 添加 D-MEM を 100 μ L/well 添加、3 日間インキュベート後、各 well の培養液を 80 μ L ずつ採取し、培養液中のグリセロール量を「F-キットグリセロール」（ペーリンガー・マンハイム社製）にて測定した。平均値の有意差検定は Student's t-test にて行い、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

【0035】

ハスの葉抽出乾燥物およびケルセチンの脂肪細胞における脂肪分解作用を調べるため、上記測定を行った。被験培地中にハスの葉抽出乾燥物 0.5～500 μ g/mL、ケルセチン 0.5～500 μ M、陽性コントロールとしてイソプロテレノールを 10^{-8} M～ 10^{-5} M 添加して、脂肪細胞 3T3-L1 中に蓄積された脂肪が分解されて培地中に放出されたグリセロール量を測定した。その結果、ハスの葉抽出乾燥物は 500 μ g/mL で、ケルセチンは 5 μ M～500 μ M にかけて有意に脂肪分解を促進することが明らかとなった。結果を図 3 に示す。

【0036】

[実施例 6]

Wistar 系ラット雌性 5 週齢を予備飼育 4 日間行った後に、ラットの平均体重がほぼおなじになるように群分けした。群分けは、1 群あたり 8 匹として、通常食摂取群、高脂肪食群、高脂肪食+ハスの葉抽出物 0.01g/g 摂取群（高脂肪食 1g あたりハスの葉抽出物 0.01g、以下同様）、高脂肪食+ハスの葉抽出物 0.05g/g 摂取群の 4 群にわけた。高脂肪食群の餌には、デンプン、ショ糖、ラード油（10%）、コーン油（5%）、コレステロール（1%）を添加した。各群 2 週間飼育後、解剖した。解剖開始 6 時間前に餌を抜き、絶食させた。腹腔内脂肪を摘出し、重量を測定した。体重 100g あたりの腹腔内脂肪は、通常食摂取群は 2.2340 ± 0.6427 g、高脂肪食摂取群は 3.9071 ± 1.2562 g、高脂肪食+ハスの葉抽出物 0.01g/g 摂取群は 3.5564 ± 0.8805 g、高脂肪食+ハスの葉抽出物 0.05g/g 摂取群は 2.7745 ± 0.9099 g であった。

【0037】

【実施例 7】 2 型糖尿病モデルマウスKK-A^yマウスに対するハスの葉抽出物の血糖降下作用

2 型糖尿病モデルマウスKK-A^yマウス雄性4週齢を 3 日間の予備飼育後、体重により 1 群 1 0 匹で 2 群に分けた。群分け後、血糖値を測定した。溶媒対照群には水道水を飲水させ、ハスの葉抽出物給水群にはハスの葉抽出乾燥物10mg/mlで溶解したハスの葉抽出物水を飲水させた。飲水は自由摂取とした。尚、餌 (CRF-1) も自由摂取とした。一週間ごとに血糖値の測定を行った。血糖値の測定は、6 時間の絶食後行った。また、投与開始後 2 5 日目の非絶食下における血糖値も併せて測定した。結果を図 4 , 5 に示す。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 8 】

【図 1】 CHO細胞における、ハスの葉抽出物添加による c AMPの集積を示す図である。

【図 2】 CHO細胞における、ケルセチンによる c AMPの集積を示す図である。

【図 3】 ハスの葉抽出物、ケルセチンによる、3T3-L1細胞からのグリセロール放出量を示す図である。

【図 4】 2 型糖尿病モデルマウスにハスの葉抽出物を投与した時の血糖降下作用を示す図である。

【図 5】 ハスの葉抽出物を投与開始後25日目の 2 型糖尿病モデルマウスの血糖値を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Dairies Corporation

<120> PLANT-DERIVED BETA 3-ADRENOCEPTOR AGONISTS AND USES THEREOF

<130> M1-A0302

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 1

ccgctagcca ccatggctcc gtggcctcac gagaag

36

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

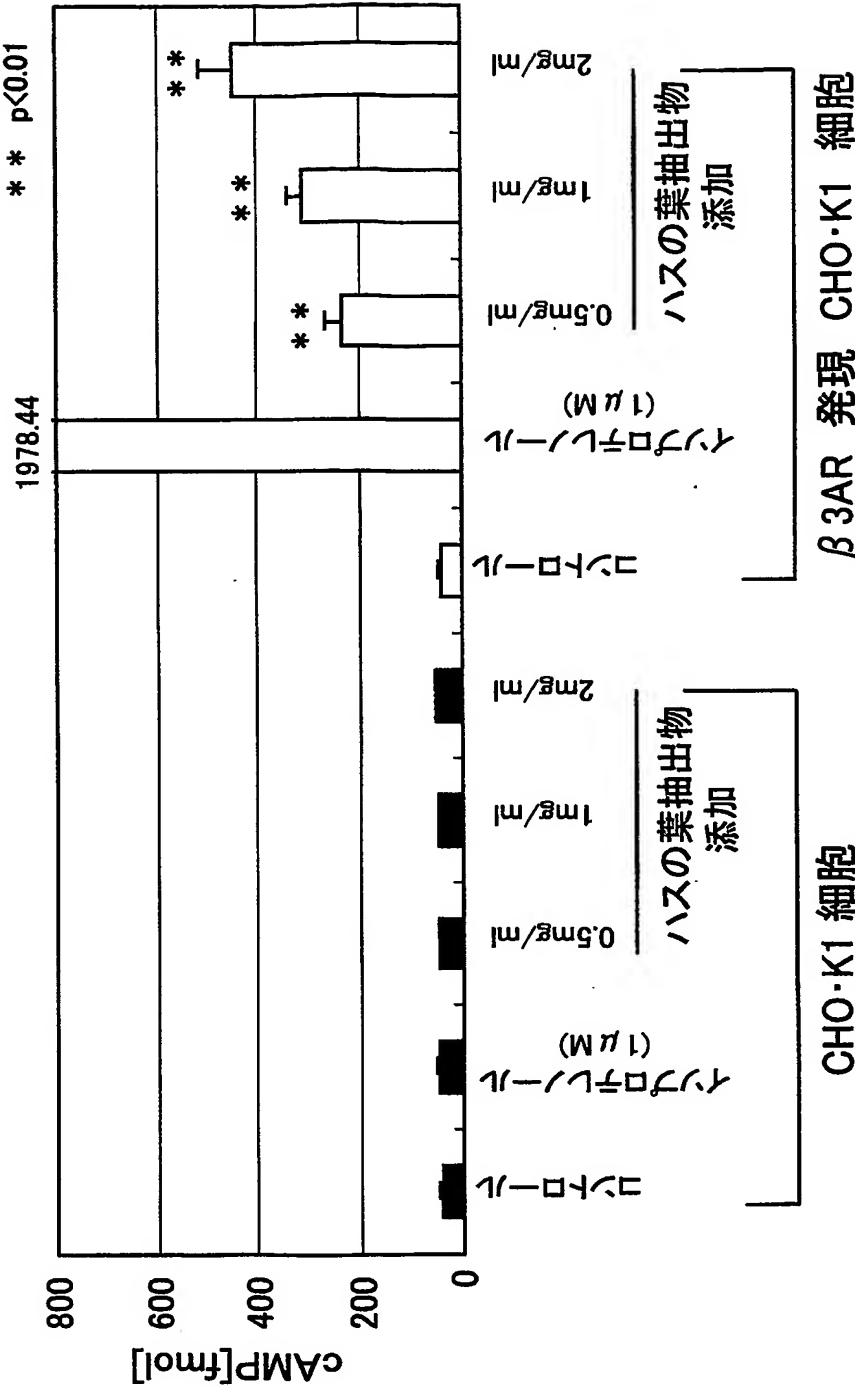
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 2

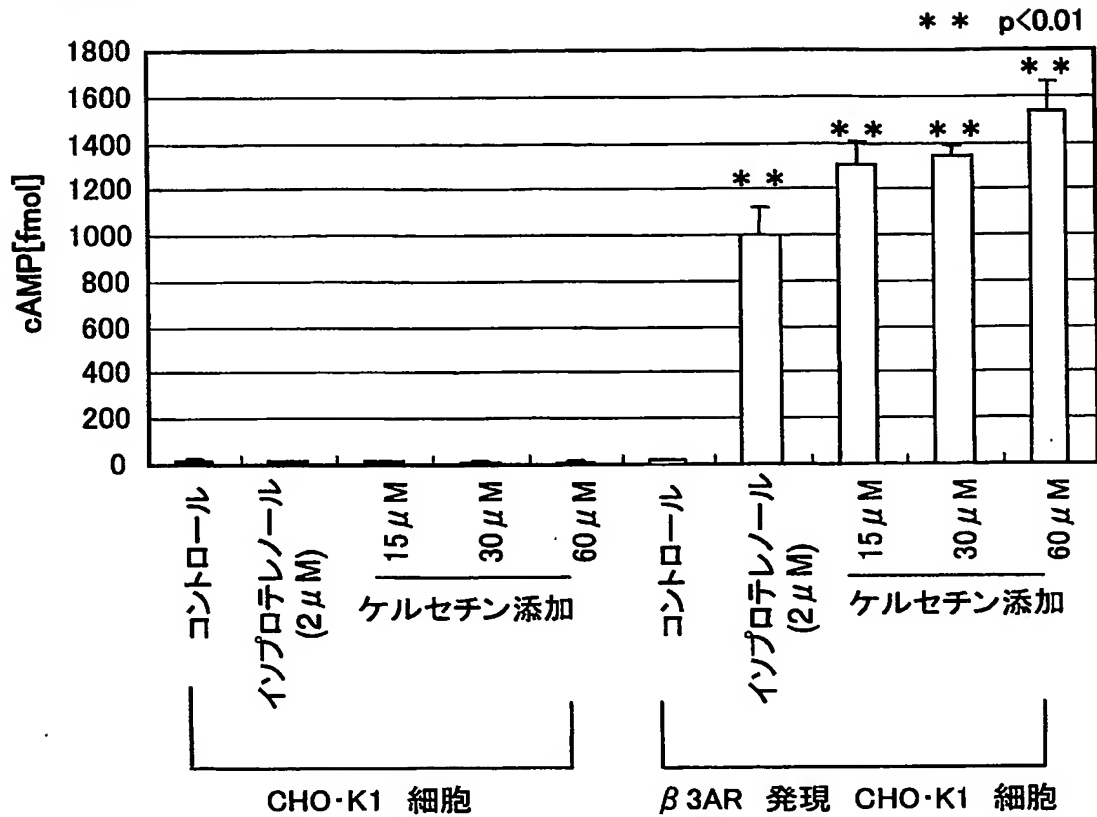
ccgaattcta cccgtcgagc cgttggcaaa g

31

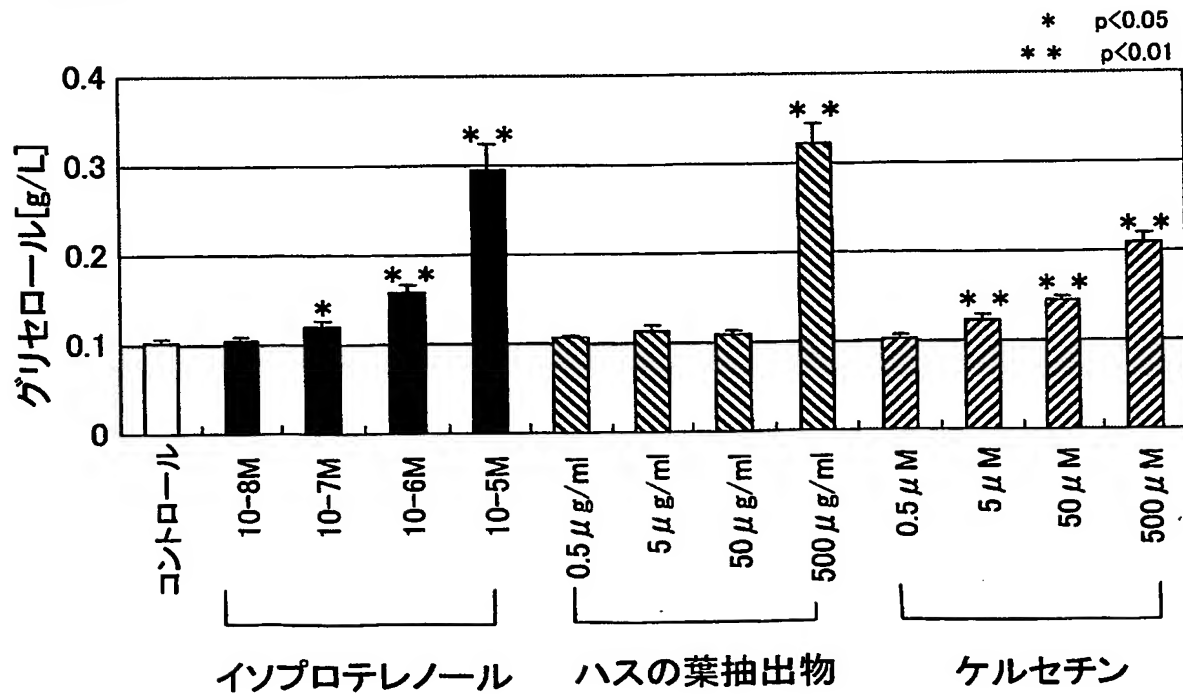
【書類名】 図面
【図 1】



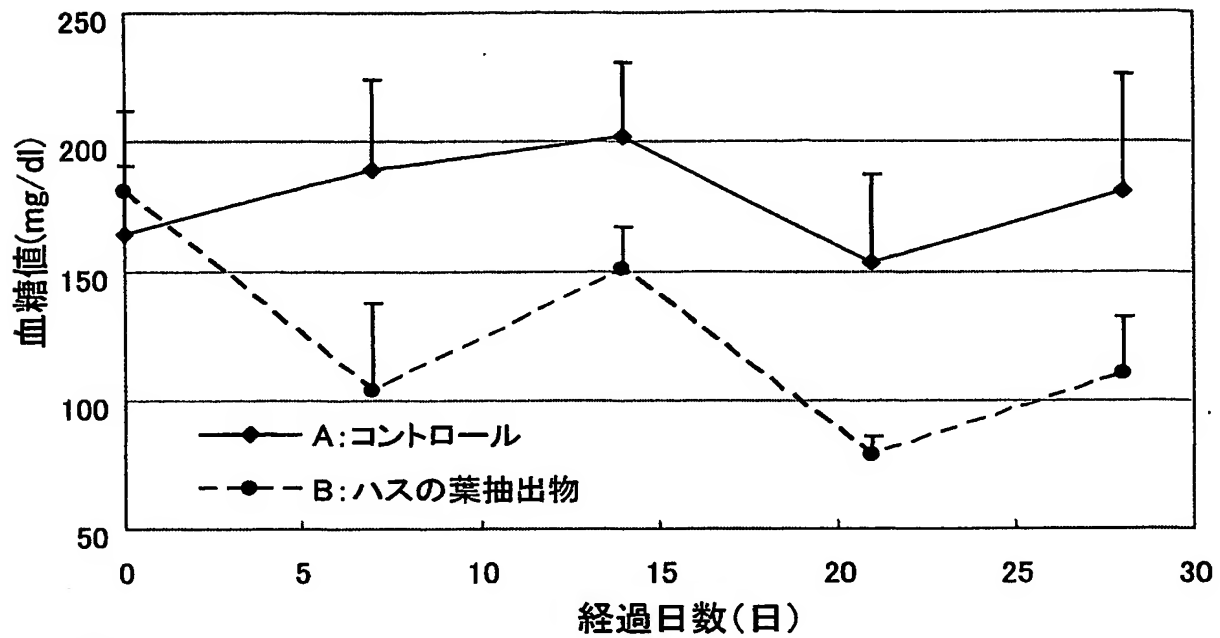
【図 2】



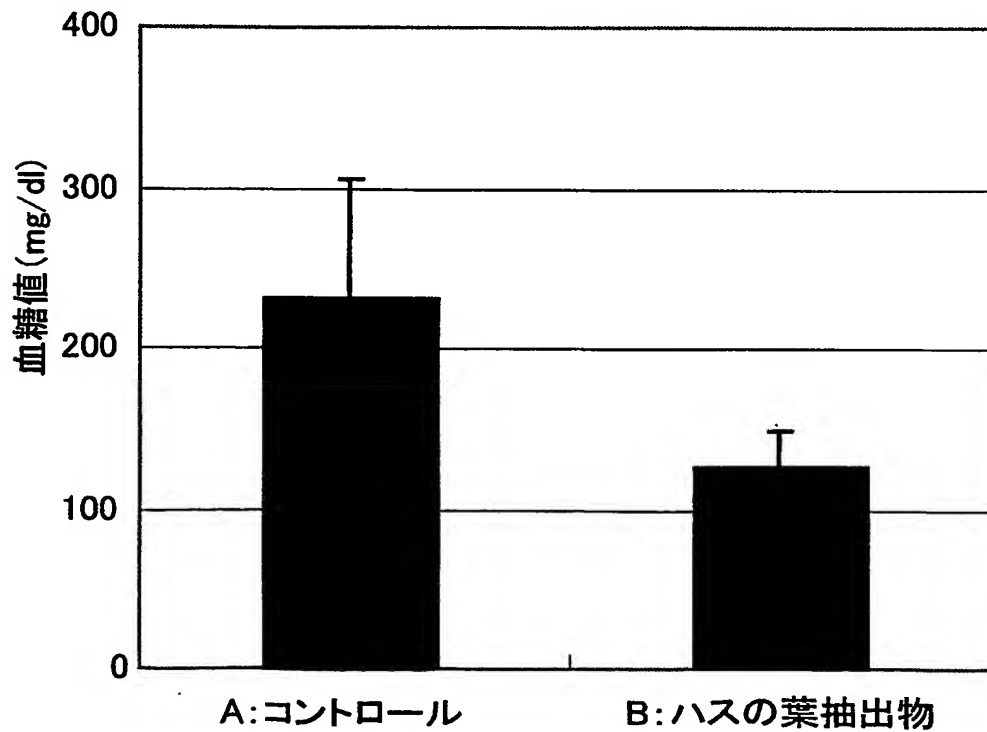
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ハス科植物の有効成分を明らかにし、該有効成分に基づいた新たな物質、具体的にはアドレナリン β_3 作動物質を提供する。

【解決手段】 ハスの葉の抽出物を作製し、その有効成分の一つがケルセチンであることを見出した。また、ケルセチンをヒト β_3 アドレナリンレセプター発現細胞や糖尿病モデルマウスに作用させ、その効果を評価した結果、ケルセチンがアドレナリン β_3 アゴニストとして作用することにより肥満改善効果及び抗糖尿病作用をもたらすことを具体的に見出した。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 M1-A0302
【提出日】 平成16年10月29日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-374836
【補正をする者】
【識別番号】 000006138
【氏名又は名称】 明治乳業株式会社
【代理人】
【識別番号】 100102978
【弁理士】
【氏名又は名称】 清水 初志
【手続補正1】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 発明者
【補正方法】 変更
【補正の内容】
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所内
【氏名】 坪井 洋
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所内
【氏名】 池上 秀二
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所内
【氏名】 神山 智敬
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社研究企画部内
【氏名】 紀 再思
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社栄養科学研究所内
【氏名】 浅見 幸夫
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社研究企画部内
【氏名】 伊藤 裕之
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所内
【氏名】 小田 宗宏
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社研究企画部内
【氏名】 進 和男
【その他】 本補正書で補正する理由は、発明者を、「坪井洋」「池上秀二」「神山智敬」「紀再思」「浅見幸夫」「伊藤裕之」「小田宗宏」「進和男」の8名を記載すべきところを出願時に誤って「坪井洋

」「池上秀二」「神山智敬」「紀再思」「浅見幸夫」のみにして
しまった為であります。

特願 2 0 0 3 - 3 7 4 8 3 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 6 1 3 8]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 1 0 月 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都江東区新砂 1 丁目 2 番 1 0 号

氏 名

明治乳業株式会社